

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



# **Nanopartículas na abordagem terapêutica da osteomielite de origem bacteriana**

**Marisa da Conceição Moreira**

**Mestrado Integrado em Ciências  
Farmacêuticas**

2017

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



# **Nanopartículas na abordagem terapêutica da osteomielite de origem bacteriana**

**Marisa da Conceição Moreira**

Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentada à  
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia

**Orientadora: Professora Doutora Ana Francisca Bettencourt**

2017

## Índice

Agradecimentos .....	5
Resumo/ abstract .....	6
Lista de abreviaturas e acrónimos.....	8
Introdução .....	9
Metodologia.....	11
Osteomielite de origem bacteriana: apresentação clínica da doença .....	12
Classificação da doença .....	13
Etiologia e patogenia.....	14
Epidemiologia.....	15
Diagnóstico .....	15
Tratamento.....	16
Complicações .....	18
Antibioterapia oral e parentérica .....	18
Antibioterapia local .....	19
Nanomateriais: aspectos regulamentares, tecnológicos e toxicológicos.....	20
Endocitose de nanomateriais .....	23
Nanopartículas metálicas .....	24
Nanopartículas lipídicas .....	25
Nanopartículas poliméricas .....	26
Nanopartículas de cálcio .....	27
Discussão .....	28
Conclusões .....	30
Bibliografia.....	30

## **Índice de figuras**

Figura 1 Esquema representativo dos aspectos gerais da abordagem terapêutica da osteomielite.....	18
Figura 2 Esquema representativo dos principais tipos de nanopartículas utilizadas no tratamento da osteomielite.....	20

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1 Factores de risco que predispõe para a osteomielite.....	12
Tabela 2 – Classificação de Lew e Waldvogel da Osteomielite.....	14

## **Agradecimentos**

Agradeço, antes de mais, à Professora Doutora Ana Francisca Bettencourt, orientadora desta monografia, pelos conhecimentos científicos que me transmitiu e pela disponibilidade que sempre manifestou para o esclarecimento de qualquer dúvida.

Agradeço, também, ao meu mestre e Professor Miguel Graça Moura pelo apoio incondicional ao longo deste trabalho.

## Resumo

A osteomielite é uma doença inflamatória, de apresentação clínica bastante heterogénea, geralmente de origem bacteriana. As bactérias, em particular as da espécie *Staphylococcus aureus* (principal agente etiológico desta infecção), têm a capacidade de formar biofilmes em superfícies bióticas ou abióticas, fazendo desta uma infecção refractária ao tratamento convencional e de difícil erradicação. A recomendação geral para o tratamento da osteomielite crónica é de 4 a 6 semanas de terapia antibiótica por via parentérica.

Na última década, a investigação tem procurado desenvolver estratégias terapêuticas a fim melhorar a efectividade dos antibióticos disponíveis contra os biofilmes, encapsulando estes fármacos em micro e nanopartículas. Estes sistemas de administração localizada de fármacos permitem ultrapassar alguns problemas da terapêutica actual. No entanto, apresentam vários desafios do ponto de vista regulamentar, tecnológico, clínico e de segurança que dificultam a sua utilização clínica.

As principais vantagens são: a possibilidade de libertação dirigida ou modificada de fármacos, a veiculação de fármacos lipofílicos ou hidrofílicos; a protecção do fármaco encapsulado, a redução da toxicidade, a minimização das flutuações entre concentrações tóxicas e subterapêuticas nos tecidos-alvo; a melhoria a efectividade dos antibióticos disponíveis contra os biofilmes.

No âmbito da nanomedicina utilizada no tratamento de infecções ósseas, os nanossistemas de maior relevo são os seguintes: nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas de cálcio e nanopartículas metálicas. As nanopartículas podem incorporar fármacos de interesse ou exibir actividade bactericida intrínseca. Cada um destes nanossistemas tem as suas particularidades, benefícios e inconvenientes, naturalmente relacionadas com as suas características físico-químicas.

Este trabalho analisa a bibliografia recente (foram consultados artigos científicos publicados desde Janeiro 2011 até Agosto de 2017) relacionada com a etiologia, a patogenia, a epidemiologia, o diagnóstico e o tratamento da osteomielite, com especial ênfase nas nanopartículas como sistemas de veiculação de fármacos, sublinhando o seu potencial como futuras ferramentas úteis no tratamento da osteomielite.

Concluimos que as nanopartículas poderão ter um papel revolucionário na terapêutica da osteomielite, embora seja fundamental elaborar mais estudos, nomeadamente, no âmbito da nanotoxicologia.

**Termos-chave:** osteomielite; antibióticos; terapêutica; nanopartículas; bactérias

## Abstract

Osteomyelitis is an inflammatory disease, with a very heterogeneous clinical presentation, usually of bacterial origin. Bacteria, in particular *Staphylococcus aureus* (the main etiological agent of this infection), have the ability to form biofilms on biotic or abiotic surfaces, making it an infection resistant to conventional treatment and difficult to eradicate. The general recommendation for the treatment of chronic osteomyelitis is 4 to 6 weeks of parenteral antibiotic therapy.

In the last decade, research has sought to improve the effectiveness of antibiotics available against biofilms by encapsulating these drugs in micro and nanoparticles. These local drug delivery systems allow to overcome some of the problems of the actual therapeutics, although they present many challenges from the regulatory, technological, clinical and safety point of views that hamper clinical use.

The main advantages are: the possibility of making a targeted or modified release of drugs, delivery of lipophilic or hydrophilic drugs; protection of the encapsulated drug, reduction of the toxicity, minimization of the fluctuations between toxic and sub-therapeutic concentrations in target tissues; improve the effectiveness of antibiotics available against biofilms.

In the field of nanomedicine applicable to the osteomyelitis treatment, the most relevant nanosystems are the following: lipid nanoparticles, polymer nanoparticles, calcium nanoparticles and metal nanoparticles. As nanoparticles may incorporate drugs of interest or exhibit intrinsic bactericidal activity. Each of these nanosystems have its peculiarities, benefits and drawbacks, naturally related to its physicochemical characteristics.

This work analyses a recent bibliography (scientific articles published between january of 2011 and august of 2017 were consulted) related to the etiology, pathogenesis, epidemiology, diagnosis and treatment of osteomyelitis, with special emphasis on nanoparticles as drug delivery systems, underlining its potential as future useful tools without treatment of osteomyelitis.

We concluded that nanoparticles can have a revolutionary role on osteomyelitis therapeutics, though It is fundamental to elaborate more studies, namely about nanotoxicology.

**Key-words:** osteomyelitis; antibiotics; therapeutics; nanoparticles; bacteria

## **Lista de abreviaturas e acrónimos**

DGS – Direcção Geral de Saúde

HA – Hidroxiapatite

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

MRSA – *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

NLS – Nanopartículas lipídicas sólidas

NP - Nanopartículas

PEG - polietilenoglicol

PGA – Ácido poliglicólico

PLGA – Ácido poliláctico-co-glicólico

PLLA – ácido poliláctico

PMMA – Polimetilmetacrilato

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

TMP- SMX – trimetoprim-sulfametoxazol



## Introdução

A osteomielite é uma infecção do osso, causada principalmente por bactérias, mas também por fungos, que se caracteriza por destruição do osso e necrose. (1) O material necrótico actua como reservatório para as bactérias e torna a infecção difícil de tratar, pelo que esta pode persistir e progredir para uma infecção crónica. (2)

A osteomielite crónica tem-se revelado um desafio na área da cirurgia ortopédica. Pode ser descrita como uma infecção grave e persistente do tecido ósseo. O agente etiológico depende da idade do hospedeiro, estado geral do doente e mecanismo de infecção, mas genericamente o mais comum é o *Staphylococcus aureus*. (3)

O tratamento da osteomielite implica a administração de elevadas doses de antibióticos por via endovenosa e/ou oral por um período mínimo de 4 a 6 semanas. (4) Entre os inconvenientes das terapias tradicionais é de sublinhar a exposição sistémica e repetitiva de antibióticos, o que causa constantes flutuações entre concentrações tóxicas e subterapêuticas nos tecidos-alvo.(5)

Porém, a emergência de espécies bacterianas multi-resistentes a antibióticos tem dificultado o tratamento da osteomielite.(6)

Na última década, a investigação tem procurado desenvolver estratégias terapêuticas a fim de melhorar a efectividade dos antibióticos disponíveis contra os biofilmes, encapsulando estes fármacos em micro e nanopartículas. Estas estratégias têm como vantagens: a possibilidade de fazer uma libertação dirigida ou modificada do fármaco; incorporar fármacos lipofílicos ou hidrofílicos; proteger o antibiótico encapsulado; e reduzir os efeitos indesejados.(7)

Adicionalmente, o tratamento da osteomielite crónica com sistemas de administração localizada de antibióticos tem, ainda, a vantagem de permitir atingir elevadas concentrações de antibióticos no local da infecção, sem a toxicidade sistémica associada à via parentérica. (4)

É neste contexto que as nanopartículas se apresentam como uma tecnologia de vanguarda bastante promissora para o tratamento da osteomielite de origem bacteriana. Estas tecnologias, apresentam, no entanto, vários desafios regulamentares, tecnológicos, clínicos e de segurança que têm limitado a sua introdução no mercado.

Este trabalho tem como objectivo realizar uma revisão sumária das potencialidades e problemas associados às nanotecnologias utilizadas no tratamento da osteomielite de origem bacteriana (ou ainda em desenvolvimento).

Optámos por restringir a nossa pesquisa à osteomielite de origem bacteriana, porque os principais agentes etiológicos desta infecção são bactérias. Além disso, o recente advento e proliferação de espécies bacterianas resistentes às terapias antimicrobianas convencionais fazem desta uma temática muito actual e pertinente.

## Objectivos

Este trabalho tem como objectivo primordial identificar os principais tipos de nanopartículas propostas para o tratamento da osteomielite de origem bacteriana, através de uma breve revisão da literatura disponível, salientando as suas vantagens e desafios dos pontos de vista tecnológico, clínico, toxicológico, legislativo e económico. Tendo este desígnio presente, esta investigação tem como objectivos específicos:

- Definir claramente, a osteomielite e referir os sistemas de classificação propostos para esta doença;
- Definir nanotecnologias;
- Elencar e distinguir os diferentes tipos de nanopartículas utilizados no tratamento da osteomielite;
- Avaliar as vantagens, limitações e desafios destas nanotecnologias.
- Caracterizar a osteomielite sob os pontos de vista da etiologia, fisiopatologia, patogenia e epidemiologia;
- Estudar o mecanismo de infecção do principal agente etiológico da osteomielite de origem bacteriana;
- Compreender quais os critérios de diagnósticos mais relevantes e quais as ferramentas analíticas mais preponderantes para um diagnóstico diferencial e definitivo;
- Analisar os aspectos gerais da antibioterapia no tratamento da osteomielite, mencionando os agentes terapêuticos mais comumente utilizados;
- Referir, sumariamente, terapias adjuvantes à antibioterapia e outras medidas farmacológicas ou não farmacológicas;
- Entender as vantagens e desvantagens da administração localizada de antibióticos;
- Discutir o problema dos biofilmes e da emergência de espécies bacterianas resistentes à terapia antimicrobiana convencional, realçando de que modo a nanotecnologia pode ser uma estratégia vantajosa na terapêutica da osteomielite.

## Metodologia

Este trabalho consiste numa revisão da literatura científica publicada entre 2011 e 2017 acerca da etiologia, patogenia e abordagens terapêuticas inovadoras da osteomielite, explorando, em particular, as aplicações das nanopartículas no tratamento desta doença inflamatória. Tendo em conta os objectivos desta pesquisa, os termos-chave utilizados foram “osteomyelitis”, “treatment”, “diagnostics” e “nanotechnologies”. Estes termos genéricos foram combinados com outras palavras-chave mais específicas, de acordo com os critérios de interesse da presente investigação (como “calcium”, “PMMA”, “silver”, “titanium”...). Foram também utilizados descritores de pesquisa para aumentar a abrangência dos resultados, como por exemplo, antibiotic# de forma a incluir os termos de pesquisa “antibiotic”, “antibiotics” e “antibiotherapy”.

As pesquisas foram realizadas entre Fevereiro e Agosto de 2017, com recurso às bases de dados bibliográficas: *PubMed*, *ScienceDirect*, *B-on*, *Medscape* e *Google Scholar*.

Foram seleccionados apenas os artigos científicos escritos em idioma inglês ou português e os critérios de selecção basearam-se na relevância do seu conteúdo e data de publicação.

Foram analisados diversos estudos de natureza experimental ou observacional realizados em animais e estudos de casos clínicos em humanos . Foram também consultados vários artigos de revisão.

Foram rejeitados todos os artigos científicos anteriores a 2011.

Adicionalmente, foi consultado o livro “Pharmacotherapy: a pathophysiological approach” (7ª Edição) da autoria de Dipiro e colaboradores.

## Osteomielite de origem bacteriana: apresentação clínica da doença

A osteomielite foi pela primeira vez descrita por Chassaignac, em 1852. Considerando a etimologia da palavra, osteomielite deriva da aglutinação dos termos gregos *osteon* (que significa osso) e *muelinos* (que significa medula). Simplificadamente, osteomielite traduz uma inflamação da medula óssea causada por um organismo infeccioso. Osteomielite, distingue-se de osteíte por esta última descrever o comprometimento da totalidade do órgão, incluindo o córtex e o periósteo. Actualmente, na literatura médica, estes dois termos são, por vezes, utilizados de forma indistinta. (4,8)

O tecido ósseo pode ser considerado um nanocompósito composto por colagénio e hidroxiapatite (HA), contendo fosfato de cálcio. Embebida nesta matriz estão osteoblastos, osteoclastos e pequenas proteínas. (9)

A osteomielite é uma infecção do osso, causada principalmente por bactérias, mas também por fungos, que se caracteriza por destruição do osso e necrose. (1) O material necrótico actua como reservatório para as bactérias e torna a infecção difícil de tratar, pelo que esta pode persistir e progredir para uma infecção crónica. (2)

Esta doença infecciosa tem uma patofisiologia e apresentação clínica bastante heterogéneas. No exame físico podem estar presentes os sinais clássicos da inflamação – dor, edema, vermelhidão e calor.(10) Já o diagnóstico definitivo e o tratamento requerem uma abordagem multidisciplinar, integrando a informação proveniente de diferentes ferramentas de análíticas.(8) O prognóstico da doença depende grandemente do mecanismo de infecção, da virulência do agente patogénico, do sistema imunitário do hospedeiro e da existência de co-morbididades. (4)

Entre os factores (tabela 1) que contribuem para o risco aumentado de osteomielite, podemos citar: malnutrição, compromisso da função hepática ou renal, diabetes *mellitus*, insuficiência respiratória, imunodeficiências (por exemplo SIDA), tumores malignos, consumo de nicotina ou drogas injectáveis, imunossupressão (por exemplo doentes transplantados), tenra idade ou idade avançada, insuficiência venosa crónica, etc. (8)

**Tabela 1 – Factores de risco que predispõe para a osteomielite**

<b>Factores de risco sistémico</b>	<b>Factores de risco locais</b>
Malnutrição	Linfedema crónico
Idade (prematturos, recém-nascidos, crianças, pessoas de idade avançada...)	Insuficiência venosa crónica
Compromisso da função renal ou hepática	Macroangiopatia
Diabetes <i>mellitus</i>	Vasculite dos pequenos vasos
Insuficiência respiratória (ex. síndrome da dificuldade respiratória, asfixia perinatal)	Neuropatia
Imunodeficiências (ex. SIDA)	Cicatrizes extensas
Imunossupressão (ex. quimioterapia, transplantação)	Fibrose induzida por radiação
Tumores malignos	
Consumo de nicotina	

Adaptado das referências (8) e (2)

## **Classificação da doença**

Não existe uma classificação unívoca da osteomielite. Segundo a classificação proposta pelos autores Lew e Waldvogel, em 1970 (tabela 2), a osteomielite pode ser distinguida de acordo com a via pela qual o organismo infeccioso atinge o osso.(4,11)

A infecção que resulta da propagação através da corrente sanguínea é denominada osteomielite hematogénica. A osteomielite hematogénica afecta, preferencialmente, doentes pediátricos e, por norma, é causada por um único microorganismo. Na esmagadora maioria dos casos, a osteomielite hematogénica atinge indivíduos com menos de 16 anos, com uma única excepção – a osteomielite vertebral que ocorre mais frequentemente em doentes com mais de 50 anos de idade. Estes dados epidemiológicos são hoje suportados pelos conhecimentos da histologia do osso nas diferentes faixas etárias. (2,8)

Quando o microorganismo atinge o osso por via de uma infecção de tecidos adjacentes ao osso, é designada osteomielite contígua. Esta categoria inclui as infecções que resultam da inoculação directa, como consequência, por exemplo, de traumas ou intervenção cirúrgica. Nestes casos, a infecção é frequentemente causada por diferentes agentes patogénicos e atinge, tendencialmente, indivíduos com mais de 50 anos. (2,8)

Os indivíduos com doenças vasculares periféricas têm um risco acrescido de desenvolvimento de osteomielite, pelo que, regra geral, são incluídos numa terceira categoria - osteomielite associada à insuficiência venosa.(4,8)

Relativamente à duração, a osteomielite pode ser classificada em aguda ou crónica. A osteomielite aguda manifesta-se decorridos alguns dias (até 2 semanas) após a inoculação do agente patogénico e caracteriza-se por edema, formação de pus, congestão venosa e trombose dos pequenos vasos; ao passo que a osteomielite crónica torna-se sintomática várias semanas ou meses após a infecção e caracteriza-se por recorrência de episódios agudos, extensas áreas de isquémia, necrose e formação de sequestros.(8,11)

Existe, ainda, um outro sistema de classificação, proposto por Cierny e Mader, em 1984, que se baseia em critérios anatómicos e características do hospedeiro. Quando a infecção está restrita à medula óssea, diz-se que a osteomielite é medular. Se a infecção estiver restrita à região cortical do osso, a infecção óssea é superficial. Se a infecção tem limites bem definidos e a estabilidade do osso é preservada fala-se numa infecção localizada, no entanto, se a infecção envolver a totalidade da circunferência do osso e revelar instabilidade antes ou após desbridamento, estamos perante uma infecção difusa. (11)

Cierny e Mader propuseram um último critério de classificação que tem em consideração o estado fisiológico do hospedeiro, isto é, se o doente é saudável ou apresenta co-morbilidades ou outros factores de risco que possam condicionar o curso da infecção.(11)

O sistema de classificação ideal deveria ter em linha de conta dados relativos à histologia, etiologia, patofisiologia, evolução temporal da infecção e aspectos relativos

ao hospedeiro. De uma maneira geral, o sistema de classificação proposto por Lew e Waldvogel (tabela 2) é o mais recomendado para aplicação na prática clínica, embora a classificação de Cierny e Mader possa ser mais útil quando se faz um estudo casuístico da abordagem terapêutica mais adequada.(11)

<b>Tabela 2 – Classificação de Lew e Waldvogel da Osteomielite</b>	
<b>Mecanismo de infecção óssea</b>	<b>Características</b>
Hematogénica	A infecção propaga-se através da corrente sanguínea. Afecta, predominantemente, doentes pediátricos.
Contígua	Resultante de inoculação directa do microorganismo na sequência de traumatismos ou intervenções cirúrgicas.
Associada à insuficiência vascular	A diabetes <i>mellitus</i> e doenças vasculares periféricas são factores de risco.
<b>Duração da infecção</b>	
Aguda	Edema, formação de pus, congestão vascular, trombose dos pequenos vasos.
Crónica	Recorrência de episódios agudos. Grandes extensões de isquémia, necrose e formação de sequestros.

Adaptado de (11)

### **Etiologia e patogenia**

Cerca de 75% dos casos de osteomielite crónica são provocados pelas espécies bacterianas *Staphylococcus aureus* e staphylococci coagulase-negativos. Com menor frequência - e dependendo das características intrínsecas do doente que possam predispor para a infecção – a osteomielite crónica pode ainda ser causada por *streptococci*, patogénicos gram-negativos (enterobactérias, pseudomonas), bactérias anaeróbias e, mais raramente, micobactérias ou fungos. (8)

A infecção provoca um aumento da pressão intramedular, como consequência da acumulação do exsudado inflamatório, que por sua vez desencadeia um descolamento periosteal; estes fenómenos conduzem a trombose vascular, necrose óssea e separação dos fragmentos ósseos desvascularizados (sequestros). Os canais haversianos encontram-se bloqueados com tecido fibroso e o tecido ósseo fica rodeado por periosteio espessado e músculo fibrosado, dificultando a penetração dos antibióticos nestas estruturas relativamente avasculares.(3)

As bactérias do género *Staphylococcus* fazem parte da grande variedade de organismos comensais que colonizam a pele e as membranas mucosas de humanos e outros mamíferos. Porém, alguns membros deste género bacteriano de que são exemplos *S. aureus* e *S. epidermidis*, são também responsáveis por infecções oportunistas. Um dos motivos pelo qual, os *Staphylococci* são particularmente problemáticos está relacionada com a sua capacidade para formar biofilmes.(12)

Os biofilmes podem ser definidos como comunidades estruturadas de bactérias que se encontram embebidas numa matriz polisacáridica. Estes biofilmes podem desenvolver em superfícies bióticas ou abióticas, impedindo a penetração dos antibióticos e possibilitando a evasão das bactérias à resposta imunitária. (7,12) Os *Staphylococci* possuem receptores (adesinas) que promovem adesão do biofilme a componentes proteicos da matriz, bem como a adesão intercelular. (4,13) Adicionalmente, as bactérias sensíveis ao antibiótico têm uma taxa de replicação menor que está relacionada com um estadio metabólico estacionário. (7,13) Uma vez que os antibióticos actuam em vias metabólicas – como a tradução do RNA, actividade enzimática e replicação do DNA – a sua actividade está diminuída aquando da existência de biofilmes.(7)

As características anatómofisiológicas de alguns ossos parecem predispor-los para a infecção. (2)

## **Epidemiologia**

A osteomielite é particularmente prevalente entre os idosos, diabéticos, crianças e indígenas de países subdesenvolvidos. (5)

A incidência da osteomielite nos Estados Unidos é de 1-2%, porém esta doença inflamatória dos ossos é bastante mais prevalente em países em desenvolvimento e mais comum em determinadas populações de doentes: cerca de 1 em cada 5000 crianças, 1 em cada 1000 neonatos, 1 em cada 250 doentes com anemia falciforme, 1 em cada 7 diabéticos e um em cada 3 doentes com o pé perfurado. (5)

Não foram encontrados dados acerca de incidência da osteomielite em Portugal.

## **Diagnóstico**

O tratamento e diagnóstico da osteomielite é, ainda, um desafio para cirurgiões, microbiologistas e histopatologistas. (14,15)

O historial e o exame clínico podem fornecer importantes indícios para o diagnóstico. Todavia, a apresentação da doença é muito heterogénea e existem diferentes critérios de diagnóstico. Com relativa frequência, os sintomas de osteomielite crónica são discretos e os sinais clássicos de infecção estão ausentes. Em doentes com idade muito avançada, imunocomprometidos ou com polineuropatias, frequentemente apenas um ou dois sintomas são encontrados. (8)

Segundo a Direcção Geral de Saúde (DGS), a osteomielite deve cumprir pelo menos um dos critérios de diagnóstico: (16)

1. Cultura positiva em biópsia óssea;
2. Observam-se sinais evidentes de osteomielite, numa intervenção cirúrgica ou em estudo histopatológico;

3. Pelo menos dois dos seguintes sinais ou sintomas sem outra causa que os explique: febre ( $> 38^{\circ}\text{C}$ ), tumefacção, tensão, calor ou drenagem da zona suspeita de infecção e, pelos menos, um dos seguintes:
  - a) Hemocultura positiva;
  - b) Resultado positivo de uma prova para a detecção de antígenos no sangue (por exemplo *H. influenza*; *S. pneumoniae*)
  - c) Evidência radiológica de infecção.

Numa tentativa de padronizar os critérios de diagnóstico, em 2010, Schmidt e colaboradores elaboraram um algoritmo que permite estimar a probabilidade de existência de um quadro clínico de osteomielite, baseando-se nos seguintes factores: historial clínico, achados clínicos, resultados dos testes laboratoriais (de realçar o valor de biomarcadores da infecção como a contagem de leucócitos e a proteína C reactiva), exames imagiológicos, identificação do agente patogénico e análise celular. (14)

Tiemann e colaboradores, referem num artigo publicado em 2014 que o exame histológico desempenha um papel crítico para o diagnóstico de osteomielite e para o diagnóstico diferencial entre osteomielite aguda e osteomielite crónica, permitindo também determinar a terapêutica mais adequada. Nesse mesmo artigo, os autores discutem, igualmente, os problemas que comprometem a validade, a reprodutibilidade e a exequibilidade dos critérios sugeridos por Schmidt e colaboradores, dos quais destacamos o facto de a detecção e identificação do agente patogénico poder demorar mais de 14 dias, condicionando, assim, o início da terapêutica e favorecendo infecções oportunistas. (14)

Efectivamente a cultura óssea continua a ser o método de diagnóstico de eleição. Podem ser feitas biópsias de pelo menos 4 sítios distintos para reduzir os erros de amostragem. (10)

O recurso à ressonância magnética é muito limitado quando existem próteses metálicas. (10)

## **Tratamento**

Antes do advento dos antibióticos, as taxas de mortalidade e morbilidade da osteomielite eram mais elevadas, mesmo assim, actualmente o tratamento da osteomielite ainda é considerado um desafio, podendo ser necessário diferentes estratégias (figura 1). (5)

Devido à natureza multifactorial desta doença, o diagnóstico e tratamento requerem a intervenção concertada de uma equipa multidisciplinar. (8) Os objectivos do tratamento são a resolução da infecção e a prevenção de sequelas a longo prazo. Contudo, o prognóstico depende, largamente, da natureza aguda ou crónica da infecção e da rapidez com que a terapêutica adequada é iniciada. Doentes com osteomielite aguda têm um melhor prognóstico, comparativamente aos doentes com osteomielite crónica. (2)

Genericamente, a osteomielite aguda é tratada com êxito através de antibióticos por via endovenosa. Já o tratamento da osteomielite crónica é mais



complexo e requer uma abordagem multidisciplinar que consiste em 3 etapas: desbridamento cirúrgico, terapia sistêmica com antibióticos durante 4 a 6 semanas e administração local de antibióticos.(4)

O desbridamento de todos os tecidos inviáveis ou infectados é crítico, pois a permanência de restos de tecido necrótico ou infectado pode resultar em recorrência da osteomielite.(17)

A remoção cirúrgica dos tecidos inviáveis ou infectados resulta em enfraquecimento do suporte músculo-esquelético e causa desfigurações inestéticas, que frequentemente requerem a implantação de dispositivos permanentes de fixação.(18)

No tratamento da osteomielite é imprescindível a administração dos antibióticos apropriados, nas doses adequadas, pelo período de tempo suficiente. A demora na instituição da terapêutica com antibióticos pode favorecer a necrose óssea e dificultar a erradicação da infecção. (2)

Na abordagem terapêutica da osteomielite é também de referir o tratamento da dor, desidratação e imobilização (quando necessário), melhoria do estado fisiológico do hospedeiro, terapêutica antibiótica e cirurgia. Idealmente, a antibioterapia deve ser instituída com base nos resultados das culturas e deve ter a duração mínima de 4 a 6 semanas.(3)

O tratamento cirúrgico consiste na remoção do tecido ósseo desvitalizado e infectado, obliteração do espaço morto e cobertura com tecidos moles da zona de exposição óssea.(3) A cirurgia está indicada quando na ausência de resposta ao tratamento antimicrobiano, quando há evidência de abscesso dos tecidos moles ou suspeita de infecção articular concomitante.(17)

É também possível o uso de terapia com oxigênio hiperbárico em associação com outros métodos; o uso de cimento impregnado com antibiótico colocado localmente bem como outros sistemas mais recentes biodegradáveis. (3)

A terapia com oxigênio hiperbárico consiste na colocação do doente numa câmara hiperbárica, na qual a pressão está acima da pressão atmosférica ao nível do mar. Neste cenário, elevadas quantidades de oxigênio sob pressão dissolvem-se no plasma sanguíneo e atingem os tecidos. A hiperoxigenação dos tecidos causa lise bacteriana, proliferação de fibroblastos e colagénio, angiogénese e reparação de tecidos isquémicos, etc. Esta tem ainda como vantagens, no contexto do tratamento de infecções ósseas, a imunomodulação, redução de mediadores pro-inflamatórios e reparação dos tecidos isquémicos.(11,17)

A amputação encontra-se reservada para os casos extremos e sem resposta ao tratamento, com complicações vasculares, neurológicas e sistémicas, e nas situações em que há desenvolvimento neoplásico. (3)

Uma vez confirmado o diagnóstico, as expectativas do tratamento devem ser amplamente debatidas com o doente (figura 1), pois as consequências podem ter um grande impacto na qualidade de vida deste. (10) A qualidade de vida do doente não deve ser reduzida com o tratamento, mas sim aumentada. (8)



**Figura 1** Esquema representativo dos aspectos gerais da abordagem terapêutica da osteomielite.

## Complicações

Se, porventura, o tratamento falhar, existe o risco de recorrência local ou sistêmica da infecção, o que pode provocar sépsis e falência multiorgânica. A dependência ou abuso de analgésicos pode destruir a vida privada e profissional. Doentes geriátricos podem não conseguir superar a perda de um membro e tornam-se dependentes de cuidados permanentes.(8)

A transformação maligna é uma complicação rara e tardia que se desenvolve décadas após o diagnóstico de osteomielite crónica. Um conjunto de factores podem contribuir para esse desfecho clínico, particularmente: a ausência de tratamento de osteomielite aguda ou a falha no tratamento, associada a significativas lesões dos tecidos moles circundantes; a fraca vascularização óssea; o envolvimento sistémico e a presença de múltiplos e multirresistentes microorganismos conduzem a uma infecção óssea crónica e refractária ao tratamento. Nestas circunstâncias, a resposta inflamatória causa destruição óssea e favorece o desenvolvimento de neoplasias.(19)

A incidência da transformação maligna tem maior relevância em países em desenvolvimento, nos quais os cuidados de saúde são mais precários.(19)

## Antibioterapia oral e parentérica

A recomendação geral para o tratamento da osteomielite crónica é de 4 a 6 semanas de terapia antibiótica por via parentérica.(2,4,20) Vários regimes terapêuticos têm sido propostos, mas nenhum provou ser mais eficaz do que os restantes.(8)

No site da Organização Mundial de Saúde (consultado a 30/07/2017) <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js5406e/10.html#Js5406e.10.1>, são propostos vários regimes terapêuticos para a osteomielite que têm em consideração a idade do doente e os agentes infecciosos mais prováveis.

Idealmente, a terapêutica antimicrobiana deve ser iniciada após os resultados das culturas celulares e os antibióticos seleccionados devem fazer a cobertura dos agentes patogénicos suspeitos. Contudo, quando há infecção concomitante dos tecidos moles ou risco de sépsis, o início da terapêutica não deve ser adiado.(21)

Os  $\beta$ -lactâmicos por via intravenosa são comumente utilizados porque para além de eficazes, são bem tolerados, relativamente seguros se administrados durante períodos de tempos prolongados e, para além disso, demonstram atingir elevadas concentrações séricas.(4,8)

Com o aumento da prevalência de MRSA, novos fármacos antibióticos – como o linesolide, daptomicina e tigeciclina - têm revelado ser promissores no tratamento da osteomielite em doentes que demonstram intolerância ou fraca resposta à vancomicina, mas ainda são necessários mais ensaios clínicos.(4)

As opções terapêuticas para o tratamento da osteomielite crónica por via oral, assenta em considerações farmacocinéticas; incluem as fluoroquinolonas, TMP-SPX, os fosfomicina para bacilos gram-negativos susceptíveis, e TMP-SPX, clindamicina, linesolide para gram positivos susceptíveis.(20)

A rifampicina e o ácido fusídico são agentes terapêuticos adjuvantes que podem ser utilizados em terapia combinada com outros antibióticos. (20) O rápido desenvolvimento de resistências, limita a utilização destes agentes terapêuticos em monoterapia. (4) A rifampicina tem a particularidade de ser um dos poucos antibióticos que demonstra efectividade contra biofilmes. (4,11)

A taxa de penetração do antibiótico nos tecidos ósseos é um factor determinante para o êxito da terapêutica. Por sua vez, a extensão da penetração vai depender de características do fármaco, do grau de vascularização, das condições dos tecidos moles e da presença de corpos estranhos.(11)

### **Antibioterapia local**

Como já foi referido anteriormente, um número significativo de infecções revela-se tolerante ao tratamento antimicrobiano convencional e isso deve-se, fundamentalmente a dois factos: a emergência e propagação de espécies resistentes aos antibióticos e a capacidade do agente patogénico mais comum – *Staphylococcus spp.* – de formar biofilmes à superfície de implantes ou tecido ósseo infectado e necrótico.(13)

A fim erradicar os biofilmes, é necessária uma elevada concentração local de antibiótico, o que é grandemente dificultado pelo reduzido grau de vascularização no osso infectado, bem como pelo biofilme em si.(13)

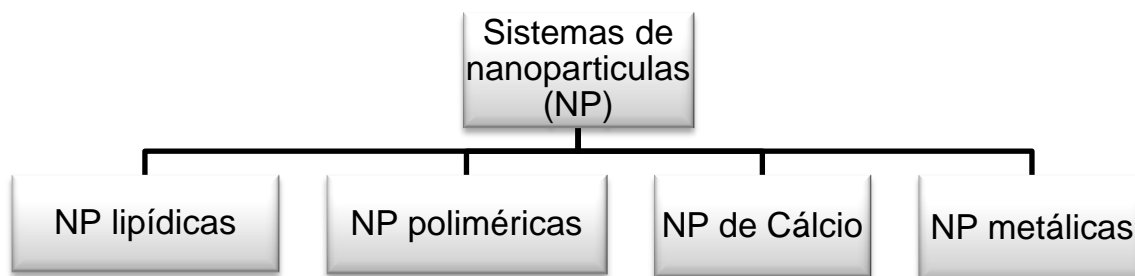
Os sistemas de administração localizada de antibióticos permitem assegurar uma elevada concentração de antibióticos no local da infecção, contornando os riscos da absorção sistémica e complicações associadas. Estes sistemas permitem, ainda, obliterar o espaço morto e ao proporcionarem a esterilização do ambiente local, favorecem a recuperação dos tecidos.(4,22)

Outra das vantagens consiste na redução do tempo de hospitalização, com consequente impacto económico. No entanto, até à data, são escassos os dados, provenientes de ensaios clínicos randomizados, que permitam comprovar a eficácia destes sistemas.(4)

Neste contexto, as nanopartículas constituem uma estratégia bastante promissora para administração localizada de fármacos que permitem ultrapassar o problema da tolerância dos biofilmes. Embora ainda apresentem vários desafios regulamentares, tecnológicos e dos pontos de vista da segurança e da clínica, as nanopartículas permitem modular a taxa de libertação do fármaco e são bastante versáteis em termos de vias de administração.(13)

### **Nanomateriais: aspectos regulamentares, tecnológicos e toxicológicos**

No âmbito da nanomedicina utilizada do tratamento de infecções ósseas, os nanossistemas de maior relevo são: nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas de cálcio e nanopartículas metálicas (figura 2).(13)



**Figura 2 Esquema representativo dos principais tipos de nanopartículas utilizadas no tratamento da osteomielite.**

A maior parte dos produtos utilizados em medicina ortopédica estão licenciados como dispositivos médicos, em vez de medicamentos. (13) Segundo a definição de dispositivo médico contante no *site* do INFARMED <http://www.infarmed.pt/> (consulta a 30/07/2017), que reflecte a legislação em vigor e que aqui se transcreve: «os dispositivos médicos são destinados, pelo seu fabricante, a serem utilizados para fins comuns aos dos medicamentos, tais como prevenir, diagnosticar ou tratar uma doença humana. No entanto, os dispositivos médicos devem atingir os seus fins através de mecanismos que não se traduzem em acções farmacológicas, metabólicas ou imunológicas, por isto se distinguindo dos medicamentos.»

A nanotecnologia é definida como o “desenho, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas de tamanho e forma controlados à nanoescala”. (23)

Contudo, a definição de “nanomaterial” nem sempre tem reunido consenso, por isso, com o intuito de obviar essa controvérsia a Comissão Europeia divulgou, em 2011, uma recomendação sobre a definição de nanomaterial, que aqui se transcreve: «por nanomaterial entende-se um material natural ou fabricado, que contém partículas num estado desagregado ou na forma de um agregado ou de um aglomerado e em cuja distribuição número-tamanho 50% ou mais das partículas têm uma ou mais dimensões externas na gama de tamanhos compreendidos entre 1 nanómetro e 100 nanómetros.» (24)

Desta definição conclui-se que os nanomateriais podem ter origem natural ou antropogénica e que estes são constituídos por nanopartículas. (24)

Com base na interacção com o corpo humano, os materiais sintéticos podem ser classificados em bioinertes, bioactivos e reabsorvíveis. (25)

Quaisquer que sejam as suas aplicações em medicina, os biomateriais devem responder a alguns requisitos imprescindíveis: devem ser biocompatíveis, não devem ser tóxicos para o hospedeiro, devem ser estáveis em ambiente biológico, devem possuir propriedades físicas adequadas, devem ser de possível fabrico e esterilização.(26)

O interesse pelos nanomateriais deve-se, essencialmente, «à reduzida dimensão das partículas e modificações ao nível da estrutura que conduzem a um aumento na área superficial em relação ao volume, tendo por consequência um aumento do número de moléculas/átomos na superfície.» Esta característica confere vantagens ao nível das propriedades mecânicas, ópticas e magnéticas, quando comparadas às dos materiais com a mesma composição físico-química, mas de maiores dimensões. (24)

Da constatação de que os mesmos constituintes - quando estruturados à escala nanométrica - revelam propriedades físico-químicas diferentes das do material de origem, decorre que a sua reactividade nos sistemas biológicos pode ser também distinta, comprometendo assim a aplicabilidade das metodologias tradicionais à avaliação dos efeitos adversos dos nanomateriais. Assim sendo, tais particularidades dos nanomateriais devem ser consideradas para uma apropriada avaliação de risco no âmbito da nanotoxicologia. (24)

Outra das consequências que pode advir do fabrico e manipulação de nanomateriais é a nanopoluição. As nanopartículas geradas aquando da confecção de nanomateriais podem ter efeitos nefastos para saúde pública e ambiente. (27)

A resolução do Parlamento Europeu, de 24 de Abril de 2009, a propósito dos aspectos regulamentares dos nanomateriais, realça a insuficiência de evidência científica para tal extrapolação na área dos nanomateriais, aconselhando a intervenção da Comissão das Comunidades Europeias para colmatar essas lacunas e adequar a legislação vigente. (24)

A deposição de nanomateriais nos tecidos pode provocar uma resposta inflamatória em que células como macrófagos e neutrófilos são recrutadas para o local de contacto, levando ao *stress* oxidativo a nível celular (produção de espécies radicalares de oxigénio), que por consequência podem causar danos no genoma das células adjacentes. Em situações de inflamação crónica, o *stress* genotóxico será permanente, com consequentes efeitos genotóxicos cumulativos que, em última instância, podem ditar a transformação maligna das células. (24)

Porém, ainda que na ausência de uma resposta inflamatória por parte do hospedeiro, os nanomateriais podem induzir efeitos genotóxicos mediados por *stress* oxidativo – através da sua interacção com componentes celulares – ou através da depleção de antioxidantes. (24)

A título ilustrativo, os iões metálicos de transição aplicados em inúmeros nanomateriais (como o cádmio, crómio, cobalto, cobre, ferro, níquel, titânio e zinco) podem ser libertados, promovendo a conversão dos metabolitos do oxigénio em espécies radicalares de oxigénio. (24)

O comportamento *in vivo* das nanopartículas é da máxima importância na determinação da sua toxicidade e na análise da sua eficácia em sistemas biológicos. A farmacocinética das nanopartículas depende de múltiplas variáveis físico-químicas e biológicas, tais como: dimensão, morfologia, características da superfície, geometria e revestimento plasma-proteína. Tal como para os fármacos, a farmacocinética das nanopartículas é descrita pela: 1) absorção; 2) distribuição; 3) metabolismo; e 4) eliminação.(9)

Um dos grandes desafios que dificulta o estudo do perfil farmacocinético das nanopartículas consiste em conceber testes de libertação *in vitro* capazes de replicar fielmente as condições *in vivo*, tipicamente caracterizadas por: 1) fluxos mais dinâmicos de fluidos; 2) perfis de pH locais específicos que estão frequentemente relacionados com estados patológicos e 3) meios muito mais complexos e selectivos.(5)

Os ensaios com modelos animais são fundamentais para o conhecimento da fisiopatologia da osteomielite, porém também neste domínio os investigadores deparam-se com vários desafios. O desafio central em todos os modelos animais é como induzir lise óssea que seja suficiente, mas não excessiva, de forma a não comprometer a estabilidade da fixação. Outro dos problemas mais citados é evitar a formação de biofilmes virtualmente não tratáveis nos dispositivos de fixação.(5)

Uma revisão sistemática recente (6), menciona os diversos modelos animais que têm sido utilizados na investigação da osteomielite causada por *Staphylococcus aureus*. Este artigo refere a importância de os estudos de experimentação animal serem meticulosamente detalhados, indicando a espécie do animal, a estirpe bacteriana, a quantidade e o método para inoculação do microorganismo, os métodos de avaliação (radiológicos, micro e macroscópicos, exames histológicos), por forma a não comprometer a reprodutibilidade do ensaio e a qualidade das conclusões ou extrapolações. (6)

Para além dos requisitos já citados – estabilidade, biocompatibilidade, segurança, possibilidade de fabrico e esterilização, propriedades físico-químicas adequadas do ponto de vista tecnológico, importa também controlar a libertação do fármaco para que não seja demasiado brusca, desenvolver formas farmacêuticas adequadas e garantir a estabilidade a longo prazo dos materiais. Dada a complexidade do desenho e desenvolvimento e os desafios clínicos a ultrapassar, apenas escassas nanopartículas chegam ao mercado.(13)

Os antibióticos diferem de acordo com o seu mecanismo de acção: alguns, como é o caso dos  $\beta$ -lactâmicos, são tempo-dependentes, o que significa que a sua efectividade depende do tempo de permanência do fármaco no local de acção; enquanto outros fármacos antibióticos, como é o caso das quinolonas e dos aminoglicosídeos, são concentração-dependentes, o que implica elevadas concentrações de fármaco num curto período de tempo. Portanto, consoante a natureza do fármaco, diferente será a natureza dos sistemas de transporte do mesmo.(5)

Diferentes locais de acção, têm diferentes especificidades. A título exemplificativo: uma infecção mandibular tipicamente requer uma terapêutica de curta duração com antibiótico quando comparado com uma infecção num osso longo; um osso esponjoso muito vascularizado, com uma taxa de remodelação óssea relativamente elevada, em princípio vai requerer uma cinética de libertação de fármaco mais intensa, comparativamente a um osso cortical, menos vascularizado, com uma taxa de remodelação mais lenta.(5)

A zona de libertação do antibiótico após cirurgia de inserção é de apenas alguns centímetros e a reologia do fluido no qual o transportador do fármaco está imerso, bem como a dos próprios fluidos biológicos pode redireccionar o fármaco para longe do local de acção. Nesse sentido, câmaras de fluxo contínuo têm sido desenvolvidas para conhecer os perfis de eluição do fármaco sob condições mais dinâmicas, a fim de mimetizar o ambiente *in vivo*. (5)

As nanopartículas podem ser revestidas com polímeros tendo em vista a estabilização do fármaco ou a optimização das características da libertação controlada do fármaco. Entre os revestimentos biocompatíveis mais utilizados estão, por exemplo: o quitosano, o colesterol, o PGLA, o PGA, etc.(28)

Todos estes aspectos, e outros aqui não detalhados, devem ser cuidadosamente estudados aquando da investigação e desenvolvimento de nanopartículas.

## **Endocitose de nanomateriais**

A endocitose é um processo fisiológico, dependente de energia, que está envolvido na internalização de nanopartículas pelas células. Este fenómeno resulta de um conjunto de eventos orquestrados que requerem o funcionamento coordenado de lípidos e proteínas da membrana plasmática. (29)

O estudo da endocitose e dos destinos intracelulares da nanopartículas são indispensáveis para projectar aplicações biomédicas em nanomedicina e realizar a avaliação citotóxica destes biomateriais. (29)

Na maioria das vezes, as nanopartículas são internalizadas por mais do que uma via (por exemplo clatrina e calveolina) o que pode resultar em respostas biológicas distintas.(29)

Não cabe aqui detalhar as diferentes vias de internalização por endocitose, mas vale a pena enfatizar que consoante a via de tráfego intracelular adoptada, diferente será o destino intracelular do nanomaterial, o que por sua vez condiciona respostas terapêuticas e efeitos adversos. (29)

A via de internalização será determinada por uma série de factores, incluindo as propriedades físico-químicas dos nanomateriais (dimensão, composição química, carga, funcionalização da superfície, reactividade superficial, adsorção superficial, etc.) (29)

A título ilustrativo, a morfologia da nanopartícula influencia directamente a internalização pelas células – nanopartículas em forma de haste sofrem maior internalização, seguidas das esferas, cilindros e cubos. Para uma dada forma geométrica, as dimensões do nanomaterial são igualmente determinantes – para nanopartículas esféricas de ouro, nanopartículas de sílica, nanotubos de carbono de parede simples e *quantum dots*, um diâmetro de 50 nm é o ideal para maximizar a taxa de *uptake* celular. Outro exemplo: nanotubos de carbono de parede simples e nanopartículas de ouro, ambos com 50 nm de diâmetro, possuem taxas de endocitose de  $10^{-3} \text{ min}^{-1}$  e  $10^{-6} \text{ min}^{-1}$ , respectivamente. Esta diferença tão significativa pode estar relacionada com as propriedades intrínsecas de cada um destes materiais.(23)

As interacções entre sistemas biológicos e nanopartículas ainda não estão esclarecidas. São necessários mais estudos neste domínio para que se possam conceber nanomateriais mais eficientes para veiculação de fármacos.(23)

As nanopartículas para tratamento de infecções ósseas podem ser divididos em dois grandes grupos: os sistemas capazes de encapsular antibióticos com relevância clínica para as infecções ósseas (isto é, nanopartículas poliméricas ou lipídicas) ou sistemas que actuam por outros mecanismos, designadamente, os que têm actividade bactericida intrínseca dos seus componentes (como as nanopartículas metálicas), reduzem a adesão bacteriana e melhoram a libertação do fármaco ou a biocompatibilidade.(13)

### **Nanopartículas metálicas**

Em medicina ortopédica, os metais são - ainda hoje- os materiais de eleição, embora existam alguns polímeros cuja utilização já está consagrada. (26)

O corpo humano necessita de diferentes elementos metálicos sob a forma de micronutrientes ou em quantidades vestigiais, contudo estes elementos são tóxicos acima de determinadas quantidades. (25)



Quando biomateriais metálicos sintéticos são implantados no interior do corpo humano, estes irão provocar diversas respostas no hospedeiro. A resposta biológica do hospedeiro aos biomateriais depende de múltiplas características do material, tais como: a composição química, a cristalinidade, a superfície topográfica, o tamanho dos poros, a morfologia e a conectividade.(25)

Um biomaterial metálico ideal deveria: ser biocompatível; possuir propriedades elásticas idênticas à do osso, elevada força; elevada resistência ao desgaste e à corrosão, boa capacidade de ligação ao osso e desgaste asséptico.(25)

O ambiente altamente corrosivo no interior do corpo humano pode fazer com que materiais altamente resistentes à corrosão, sofram corrosão acentuada neste meio. Com efeito, o aço inoxidável, o material mais resistente à corrosão, pode causar alergia crónica e reacções de toxicidade se implantado durante longos períodos. (25)

Devido às suas propriedades antimicrobianas, o primeiro metal proposto para o tratamento da osteomielite foi a prata (isolada ou sob a forma de compósitos de fio de nylon). (5) Sem dúvida, as nanopartículas de prata são os sistemas mais comumente utilizados, quer incorporadas em dispositivos médicos, quer como revestimento de cimentos ósseos de PMMA.(13)

Os iões de prata provaram ser eficazes no tratamento da osteomielite crónica, inclusivamente demonstraram ser efectivos contra estirpes bacterianas multirresistentes como o MRSA, sem desenvolver resistência bacteriana. Todavia, foi reportado que elevadas concentrações de iões prata podem provocar efeitos citotóxicos nefastos. A adição de um segundo agente químico pode contribuir para a optimização biossegurança e da actividade antibacteriana. (15)

### **Nanopartículas lipídicas**

As nanopartículas lipídicas de maior relevância são as nanopartículas lipídicas sólidas e os lipossomas. Os lipossomas permitem a encapsulação de antibióticos, a fim de controlar a libertação do fármaco e o aperfeiçoar da sua actividade contra os biofilmes. Estes sistemas podem ser administrados por via endovenosa incorporados em cimentos ósseos não-biodegradáveis ou biodegradáveis. (13)

Os lipossomas são vesículas compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas que encerram um compartimento interno de natureza aquosa. A sua estrutura confere grande versatilidade a estes sistemas, na medida em que possibilita a encapsulação de uma grande variedade de fármacos: hidrofílicos, lipofílicos ou anfifílicos. (30)

Para além disso, a superfície do lipossoma pode ser modificada e funcionalizada através de materiais com o polietilenoglicol (PEG), o que faz aumentar a sua permanência *in vivo* ou facilita a libertação dos lipossomas.(28)

Várias revisões sistemáticas reportaram que os lipossomas são dos nanosistemas mais utilizados para administração de fármacos antimicrobianos. A sua principal vantagem remete para o facto de a bicamada lipídica mimetizar as membranas celulares, o que facilita a fusão com as membranas bacterianas, e subsequente libertação do fármaco no interior dos microrganismos.(31)

A concepção de um lipossoma com propriedades anti-biofilme requer a optimização de um conjunto de factores incluindo as características do biofilme, as propriedades físico-químicas dos lipossomas e as características do agente antimicrobiano. Os lipossomas demonstraram resultados promissores na administração de antibióticos em terapias crónicas e no tratamento de infecções relacionadas com biofilmes devido à sua capacidade de diminuir a concentração mínima inibitória e os factores de virulência, comparativamente às terapias convencionais.(31)

Do ponto de vista toxicológico, os lipossomas são genericamente considerados biocompatíveis, biodegradáveis e não-tóxicos, contudo são necessários mais estudos para avaliar a toxicidade dos lipossomas a longo prazo, sobretudo quando administrado repetidamente por via parentérica. (31)

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) podem ser utilizadas como sistemas de administração de fármacos com dimensões compreendidas entre 50 e 100nm. Os lípidos sólidos utilizados nesta técnica incluem triglicéridos, ácidos gordos, glicéridos parciais, esteróides e ceras. As nanopartículas lipídicas sólidas facilitam a administração de agentes antifúngicos, por isso, podem ser utilizadas no tratamento da osteomielite de origem fúngica.(28)

### **Nanopartículas poliméricas**

Os polímeros sintéticos biodegradáveis propostos como potenciais transportadores de antibióticos para tratamento da osteomielite são predominantemente poli- $\alpha$ - hidroxiésteres. Dentro destes, os PLLA, o PGA e o PLGA destacam-se como os mais estudados. Estes compostos têm a capacidade de encapsular fármacos hidrofílicos ou hidrofóbicos, incluindo antibióticos, possibilitando a sua libertação prolongada durante longos períodos de tempo.(5)

O principal inconveniente destes polímeros remete para a possibilidade de os seus produtos da degradação ácida poderem favorecer o crescimento bacteriano, promover a reabsorção de tecidos duros e consequente perda de massa óssea. Adicionalmente, a acidificação do meio pode interferir negativamente na efectividade do antibiótico a ser transportado cuja actividade está limitada a um intervalo definido de valores de pH.(5)

No que diz respeito aos cimentos ósseos não-biodegradáveis, o PMMA tem sido o polímero mais utilizado.(13)

As esferas de PMMA foram aplicadas na clínica pela primeira vez em 1972, sob o nome comercial, Septopal®, e desde então têm sido considerados uma referência para a administração localizada de antibióticos nas cavidades ósseas. (4,5)

As esferas de PMMA carregadas com antibióticos hidrofílicos, incluindo gentamicina, ceftriaxona, tobramicina e vancomicina, têm sido utilizadas com êxito experimental e clínico no passado. Apesar disso, existem numerosas limitações associadas a esta tecnologia, nomeadamente: pelo facto de não serem biodegradáveis, a remoção dos cimentos de PMMA requer uma segunda intervenção cirúrgica após a libertação do antibiótico através da sua estrutura polimérica porosa.

Para além disso, os cimentos de PMMA e espaçadores exibem uma libertação brusca do fármaco que não só compromete a manutenção das concentrações terapêuticas de antibiótico durante o período de tempo pretendido, como promove a resistência aos antibióticos. (5)

Presentemente, o principal motivo de apreensão relativamente ao uso de sistemas de PMMA para administração localizada de antibióticos refere-se, precisamente, ao risco de indução de resistências aos antibióticos.(4)

Verifica-se uma baixa toxicidade resultante da absorção de produtos da degradação do PMMA e, com frequência, forma-se um biofilme em torno destes sistemas, dificultando a acção do antibiótico.(5)

Outros obstáculos de natureza tecnológica ainda de realçar: a alteração da composição pode ter repercussões nas propriedades físicas e mecânicas, comprometendo a função de carga; antibióticos termosensíveis ou susceptíveis a degradação por oxidação radicalar podem perder a actividade antibacteriana durante a síntese do cimento, uma vez que esta requer uma reacção de polimerização radicalar altamente exotérmica.(13)

Frequentemente, o reduzido custo desta tecnologia é apontado como a única vantagem das pérolas de PMMA para administração localizada de antibióticos.(5)

### **Nanopartículas de cálcio**

Os fosfatos de cálcio são um componente maioritário do osso, pelo que são potencialmente úteis em produtos farmacêuticos para libertação de fármacos de interesse no osso.(32) Estes gozam de propriedades que os tornam excelentes substitutos dos tecidos duros: excelente biocompatibilidade, osteocondutividade, ausência de citotoxicidade (são considerados um dos nanomateriais mais seguros), ausência de imunogenicidade, boa capacidade de carga, são totalmente bioreabsorvidos, podem apresentar uma grande variedade de estequiometrias (cobrindo vastas gamas de solubilidade), estimulam a proliferação e diferenciação dos osteoblastos, têm actividade bactericida. (5)

A grande desvantagem deste material remete para o facto de os fosfatos de cálcio serem incapazes de encapsular fármacos via intercalação.(18)

Os fosfatos de cálcio são, excelentes adsorventes de uma ampla variedade de compostos orgânicos, razão pela qual a sua fase menos solúvel, a hidroxiapatite, é usada como adsorvente cromatográfico de proteínas e ácidos nucleicos. Esta propriedade, todavia, predispõe para a libertação brusca (“burst effect”) e limita a libertação prolongada de fármacos. (5,18)

O tamanho da partícula desempenha um papel importante ao condicionar os perfis de degradação e libertação – as nanopartículas de fosfato de cálcio provaram ser mais vantajosas do que as micropartículas. (5)

Os fosfatos de cálcio podem ser esterilizados por diferentes técnicas. (18)

## Discussão

As nanopartículas são tecnologias inovadoras e promissoras no tratamento da osteomielite, muito versáteis que permitem ultrapassar os problemas das formas farmacêuticas tradicionais, otimizando a eficácia das terapêuticas medicamentosas. Apresentam inúmeras vantagens comparativamente às terapias antimicrobianas convencionais, das quais se destacam: a possibilidade de libertação dirigida ou modificada de fármacos, incorporação de fármacos lipofílicos ou hidrofílicos; protecção do fármaco encapsulado, redução da toxicidade, minimização das flutuações entre concentrações tóxicas e subterapêuticas nos tecidos-alvo; optimização da efectividade dos antibióticos disponíveis contra os biofilmes. Contudo, as nanopartículas apresentam várias limitações que têm dificultado a sua introdução no mercado.

As nanopartículas são endocitadas para o interior das células, dentro das quais vão exercer a sua actividade terapêutica. O desenho e concepção destas tecnologias requer um estudo aprofundado das estruturas subcelulares e da interacção destas com as nanopartículas de síntese, para melhor compreender o seu mecanismo de acção e, por outro lado, estudar os seus efeitos toxicológicos. Com efeito, o comportamento *in vivo* das nanopartículas é da máxima importância na determinação da sua toxicidade e na análise da sua eficácia em sistemas biológicos.

O aumento significativo da prevalência de bactérias multirresistentes aos antibióticos é um dos grandes desafios, com o qual a comunidade científica se depara actualmente. As nanopartículas são potenciais “balas mágicas”, úteis na veiculação de fármacos para o tratamento da osteomielite, uma doença infecciosa de tratamento difícil.

O farmacêutico desempenha um importante papel na terapêutica da osteomielite. Se, por um lado, o farmacêutico tem o conhecimento técnico-científico para participar na investigação e desenvolvimento de sistemas de administração localizada de antibióticos, como as nanopartículas; por outro lado, o farmacêutico hospitalar pode dar um contributo imprescindível na definição de protocolos terapêuticos de acordo com as *guidelines* internacionais, verificação da prescrição, adequação do regime terapêutico às particularidades de cada doente (por exemplo a existência de co-morbilidades pode influir na farmacocinética e requerer ajuste da dose), monitorização da toxicidade, etc. Com efeito, o farmacêutico é um profissional de saúde polivalente que reúne um saber multidisciplinar (toxicologia, microbiologia, farmacologia, fisiopatologia, etc...), que pode ser deveras relevante em contexto hospitalar.

Um artigo publicado no presente ano (33), refere exhaustivamente os contributos que o farmacêutico clínico pode dar na gestão da terapêutica de doenças infecciosas – como é o caso da osteomielite – com impactos, inclusivamente, no domínio da fármaco-economia.

Já o farmacêutico comunitário é fundamental no seguimento farmacoterapêutico do utente em ambulatório – nomeadamente, na monitorização do abuso de analgésicos, farmacovigilância, referenciação para o médico ou

psicoterapeutas nos casos em que tal se justifique e promoção da adesão à terapêutica.

Neste trabalho de revisão, consultámos vários artigos científicos sobre osteomielite e aplicações terapêuticas das nanopartículas. Nenhum dos artigos consultados tratava ou referia a existência de estudos *in vivo* pré-clínicos. Numa perspectiva futura, dependendo da sua acção principal, estes materiais poderão entrar para o mercado como dispositivos médicos, em vez de medicamentos – o que tem exigências legais distintas. Dadas as implicações para a saúde pública, acreditamos que estes nanomateriais não deveriam ser excluídos dos testes de eficácia e segurança (exigidos aos medicamentos).

Em suma, pelos dados existentes na literatura, podemos afirmar que as nanopartículas poderão ter um papel revolucionário na terapêutica da osteomielite, embora seja fundamental elaborar mais estudos, nomeadamente, no âmbito da nanotoxicologia.

## Conclusões

A osteomielite consiste numa ampla variedade de distúrbios inflamatórios dos ossos, que pode ocorrer em diferentes faixas etárias e em localizações preferenciais do esqueleto humano. O quadro inflamatório é provocado por uma infecção, geralmente, de origem bacteriana. As bactérias, em particular as da espécie *Staphylococcus aureus* (principal agente etiológico desta infecção), têm a capacidade de formar biofilmes em superfícies bióticas ou abióticas, fazendo desta uma infecção refractária ao tratamento convencional e de difícil erradicação.

As nanopartículas são tecnologias inovadoras e promissoras no tratamento da osteomielite, com claras vantagens relativamente às terapias antimicrobianas convencionais, das quais se destacam: a possibilidade de uma libertação dirigida ou modificada de fármacos, incorporação de fármacos lipofílicos ou hidrofílicos; protecção do fármaco encapsulado, redução da toxicidade, minimização das flutuações entre concentrações tóxicas e subterapêuticas nos tecidos-alvo; optimização da efectividade dos antibióticos disponíveis contra os biofilmes. Contudo, as nanopartículas apresentam várias limitações, nos domínios tecnológico, toxicológico, regulamentar, fármaco-económico e clínico, que têm dificultado a sua introdução no mercado.

No contexto do tratamento da osteomielite, as nanopartículas podem incorporar fármacos de interesse ou exibir actividade bactericida intrínseca.

No âmbito da nanomedicina utilizada do tratamento de infecções ósseas, os nanossistemas de maior relevo são os seguintes: nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas de cálcio e nanopartículas metálicas. Cada um destes tipos de nanopartículas tem as suas vantagens e inconvenientes.

Embora promissoras, as nanopartículas ainda enfrentam muitos desafios - em diferentes domínios - que dificultam a sua utilização clínica.

## Bibliografia

1. Marques C, Matos A, Ribeiro I, Gonçalves L, Bettencourt A, Ferreira J. Insights on the properties of levofloxacin-adsorbed Sr- and Mg- doped calcium phosphate powders. *J Mater Sci Mater Med*. 2016;123:1–12.
2. Armstrong EP, Friedman AD. Bone and Joint Infections. In: *Pharmacotherapy: a pathophysiological approach*. 2008. p. 1933–41.
3. Spranger A, Fernandes P. Osteomielite da tíbia com 30 anos de evolução Reflexões sobre opção terapêutica. *Rev Port Ortop e Traumatol*. 2013;21(1):57–62.
4. Gomes D, Pereira M, Bettencourt AF. Osteomyelitis : an overview of antimicrobial therapy. *Brazilian J Pharm Sci*. 2013;49(1):13–27.
5. Uskojvi V. Nanostructured Platforms for the Sustained and Local Delivery of Antibiotics in the Treatment of Osteomyelitis. *Crit Rev Ther drug Carr Syst*. 2015;32(1):1–59.
6. Reizner W, Hunter JG, O'Malley NT, Southgate RD, Schwartz EM, Kates SL. A systematic review of animal models for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Eur Cell Mater*. 2014;27:196–212.
7. Kasper S, Bétrisey B, Kikhney J, Moter A, Trampuz A, Almeida AJ. Activity of daptomycin- and vancomycin-loaded poly-epsilon-caprolactone microparticles against mature staphylococcal biofilms. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:4351–66.
8. Walter G, Kemmerer M, Kappler C, Hoffmann R. Treatment Algorithms for Chronic Osteomyelitis. *Deutsches Ärzteblatt Int*. 2012;109(14):257–64.
9. Press D. Regenerative nanomedicine : current perspectives and future directions. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:4153–67.
10. Hake ME, Oh JK, Kim JW, Ziran B, Smith W, Hak D, et al. Difficulties and challenges to diagnose and treat post-traumatic long bone osteomyelitis. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2015;25(1):1–3.
11. Lucia A, Lima L, Oliveira PR, Carvalho VC, Cimerman S. Review article Recommendations for the treatment of osteomyelitis. *Brazilian J Infect Dis*. Elsevier Editora Ltda; 2014;18(5):526–34.
12. Paharik AE, Horswill AR, Roy J, City I. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, regulation, and host response. *Microbiol Spectr*. 2016;4(2):1–48.
13. Santos-Ferreira I, Bettencourt A, Almeida AJ. Nanoparticulate platforms for targeting bone infections : meeting a major therapeutic challenge. *Futur nanomedicine*. 2015;10(20):3131–45.

14. Tiemann A, Hofmann GO, Krukemeyer MG, Krenn V, Langwald S. Histopathological Osteomyelitis Evaluation Score ( HOES ) – an innovative approach to histopathological diagnostics and scoring of osteomyelitis. *GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW*. 2014;3:1–12.
15. Lu M, Liao J, Dong J, Wu J, Qiu H, Zhou X, et al. An effective treatment of experimental osteomyelitis using the antimicrobial titanium /. *Nat Publ Gr. Nature Publishing Group*; 2016;(November):1–14.
16. Direcção Geral de Saúde. Critérios do CDC para o diagnóstico das infecções - PNCl. 2009.
17. Kishner S, Editor C, Gellman H. *Osteomyelitis Treatment & Management*. 2016.
18. Desai TA, Micro T, Sciences T, Francisco S. Nanoparticulate drug delivery platforms for advancing bone infection therapies. 2015;11(12):1899–912.
19. Moura DL, Ferreira R, Garruc A. Malignant transformation in chronic osteomyelitis. *Rev Bras Ortop*. 2017;2(2):141–7.
20. Spellberg B, Lipsky BA. Systemic Antibiotic Therapy for Chronic Osteomyelitis in Adults. *Clin Infect Dis*. 2012;54(3):393–407.
21. Hong-Nguyen Y. *Osteomyelitis Empiric Therapy*. 2015.
22. Ikpeeme IA, Oku EO, Ngim NE, Ilori IU, Abang IE. Comparison of the Outcome of Treatment of Chronic Osteomyelitis by Surgical Debridement with and without Local Antibiotic Delivery System : Experience from a Nigerian Teaching Hospital. 2013;2013(July):313–8.
23. Albanese A, Tang PS, Chan WCW. The Effect of Nanoparticle Size , Shape , and Surface Chemistry on Biological Systems.
24. Louro H, Borges T, João M. Nanomateriais manufacturados : novos desafios para a saúde pública. *Rev Port Saúde Pública [Internet]. Escola Nacional de Saúde Pública*; 2012;31(2):188–200. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpsp.2012.12.004>
25. Rahyussalim AJ, Marsetio AF, Saleh I, Kurniawati T, Whulanza Y. The Needs of Current Implant Technology in Orthopaedic Prosthesis Biomaterials Application to Reduce Prosthesis Failure Rate. 2016;2016.
26. Costa, Sá V. Os polímeros como biomateriais. :48–54.
27. Cossio MLT, Giesen LF, Araya G, Pérez-Cotapos MLS, Vergara RL, Manca M, et al. Biomateriais e sua biocompatibilidade numa abordagem multidisciplinar na



área de saúde, alimentos funcionais e medicina regenerativa. Rev Electrónica da Univar. 2012;1(8):87–90.

28. Berebichez-fridman R, Montero-olvera P, Gómez-garcía R, Berebichez-fastlicht E. An intramedullary nail coated with antibiotic and growth factor nanoparticles : An individualized state-of-the-art treatment for chronic osteomyelitis with bone defects. *Med Hypotheses*. 2017;105:63–8.
29. Ferreira LAB, Radaic A, Puggliese G., Valentini MB, Oliveira MR, B. de JM. Endocitose e tráfego intracelular de nanomateriais. *Acta Farm Port*. 2014;3(2):149–66.
30. Gao W, Thamphiwatana S, Angsantikul P, Zhang L. Nanoparticle approaches against bacterial infections. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2014;6(6):532–47.
31. Rukavina Z, Vani Ž. Current Trends in Development of Liposomes for Targeting Bacterial Biofilms. *Pharmaceutics*. 2016;8(18):2–26.
32. Stapleton M, Sawamoto K, Alm CJ, Mackenzie WG, Mason RW, Orii T, et al. Development of Bone Targeting Drugs. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1345):1–15.
33. Luisetto M. Infectious Disease Pharmaceutical Care : The Role of the Clinical Pharmacists to Improve Clinical Outcomes 2017. *J Antimicrob Agents*. 2017;3(2):1–11.